



体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における早期姉妹染色分体分離の誘発要因究明

著者	菊地 裕幸
号	52
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1142号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122775

きくち ひろゆき

氏 名（本 籍 地） 菊 地 裕 幸

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1142 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 28 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）応用生命科学専攻

論 文 題 目 体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における早期姉妹染色分体分離の誘発要因
究明

博士論文審査委員 （主査）教 授 種村 健太郎

教 授 麻生 久

教 授 豊水 正昭

博士論文内容要旨

体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における
早期姉妹染色分体分離の誘発要因究明

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

菊地 裕幸

指導教員 種村 健太郎 教授

第1章 緒論

未成熟卵母細胞（卵子）の体外成熟－体外受精－体外培養（*in vitro* maturation-*in vitro* fertilization-*in vitro* culture; IVM-IVF-IVC）は、卵巣より未成熟（GV 期）卵母細胞を採取し、体外成熟培養を経て得られた成熟（MII 期）卵子を体外受精に用い、体外培養ののちに子宮内に胚移植を行う方法である。ウシやブタなどの家畜においては、食肉処理場由来の卵巣より回収した多数の未成熟卵母細胞を、体外成熟培養で成熟卵子を得ることで、より効率的な生産が可能な技術として開発された。ヒトにおいては、ゴナドトロピン製剤投与による卵巣刺激をほとんど必要としないことから、特に多嚢胞性卵巣症候群（polycystic ovarian syndrome; PCOS）患者における卵巣過剰刺激症候群（ovarian hyperstimulation syndrome; OHSS）発症リスク軽減のため、有用な治療法として臨床応用されており、1991 年 Cha らによって初の妊娠出産成功例が報告された。

さらに近年では、白血病やガン疾患等の患者における、妊孕性温存を目的とした多数の未成熟卵母細胞の凍結保存を行うことが可能となり、原疾患治療後、妊娠を望む際には、体外成熟培養技術により成熟卵子を得ることが必要不可欠となる。しかし、体内成熟卵子に比べて体外成熟卵子における成熟率、胚発生率、着床率は、いまだ低いのが現状である。

体外成熟卵子における受精率、胚発生率、着床率の低下は、胚の異数性、倍数性などの染色体異常と関連していると報告されている。染色体異常は、主に卵子の第一減数分裂時の分離異常によって生じることが報告されていることから、体外成熟培養過程における染色体異常の発生が、体内成熟卵子と比較して受精率、胚発生率、着床率が低下している原因であることが推測される。

染色体異常のなかでも、近年加齢個体における早期姉妹染色分体分離（Premature chromatid separation; PCS）が指摘されており、本来第二減数分裂で分離するはずの姉妹染色分体が、第一減数分裂時に動原体部分が早期に分離してしまうことで、その後の過程で染色体の過不足が生じることが報告されている。

ヒト受精卵の染色体異常は約 25%、新生児では 0.3%に見られる。倍数性異常や染色体の不足などの重篤な染色体異常であれば発育停止や流産、死産となり自然淘汰されることで出生まで至ることはないが、染色体異常の種類や程度によっては妊娠継続、出生まで至ることが可能な場合もある。しかし、染色体異常をもった児は精神遅滞、奇形などの先天性疾患を伴う場合も多く、さらに次世代以降にも遺伝的疾患として影響することが懸念される。

これらのことから、体外成熟培養過程における染色体異常発生のリスクを減らすことは重要であると考えられるが、体外成熟培養とその後の胚発育過程における染色体分析を詳細に行っている報告は少ない。そこで本研究では、マウス卵子をモデルとして、体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における培養環境や条件の違いによる、染色体への影響やその誘発要因を究明することにより、その後の成熟率、胚発生率、着床率の改善や、最終的には

健児の獲得へとつながる、染色体異常のリスクが低い最適な体外成熟培養系を確立し、ヒト IVM-IVF への臨床応用を目指すことを目的とした。

第 2 章 体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における成熟率と染色体数に影響を及ぼす培養条件の探索

未成熟卵母細胞の体外成熟培養過程において、温度、気層条件、培地の組成など様々な培養条件が挙げられるが、本章では卵子成熟および染色体数に影響を及ぼす培養条件を探索すべく、培養時間の違い、卵丘細胞付着程度の違いにおける成熟率、染色体数を評価した。

まず、体内成熟卵子と体外成熟卵子における違いを評価するため、体外成熟卵子の成熟率を検討した。未成熟 ICR マウスに PMSG 5 単位を投与し、48 時間後の卵巣を採取し細切することで未成熟 (GV 期) 卵母細胞を回収し、37℃、5% CO₂ の条件下で 12 時間成熟培養を行った。体内成熟卵子は、PMSG 投与 48 時間後に hCG 10 単位を投与し、14 時間後に卵管より排卵された成熟 (MII 期) 卵子を回収した。MII 期卵子に対して低張処理、固定液にてスライド固定することで染色体標本作製し、ギムザ染色後にて染色体数をカウントした (図 1)。

体外成熟培養の結果、およそ 90%が MII 期に達しており (表 1)、体内成熟卵子と体外成熟卵子の染色体数正常率に差は見られなかった (表 2)。

次に、体外成熟培養時間が長くなるにつれて染色体異常が増加すると報告されていることから、体外成熟培養時間を 10、12、16、20 時間まで延長し、成熟率、染色体数を評価した。その結果、培養 10 時間で既にほとんどの卵子が MII 期に達しており、成熟率は 10 時間以降プラトーに達していた (表 3)。得られた成熟卵子の染色体数正常率は培養時間によって差は見られず、成熟後のエイジングによる影響は見られなかったが、16 時間、20 時間において、わずかに染色体不足の割合が上昇していた (表 4)。

次に、体外成熟培養時の卵丘細胞付着は、成熟率や受精率、胚発生率と関連すると報告されていることから、体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度に着目した。通常家畜では卵丘細胞の付着が認められない卵母細胞は培養には用いられないが、ヒトにおいて未成熟卵母細胞を回収する際、卵巣より針で吸引する過程で卵丘細胞が脱落してしまっている可能性もあることから、体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度と成熟率、染色体数を評価した。卵丘細胞 4 層以上を Grade A とし、3 層以下もしくは部分的に付着したものを Grade B、卵丘細胞の付着がなく裸化状態のものを Grade C として培養を行った (図 2)。その結果、成熟率は卵丘細胞付着の Grade A、Grade B、Grade C の順に有意に低下しており、Grade C では 12 時間後に GV 期のままである卵子も多く存在した (表 5)。得られた成熟卵子の染色体数正常率に差は見られないものの、Grade C でわずかに低下していた (表 6)。また、PCS 発生率が Grade A、Grade B、Grade C の順に有意に上昇しており、Grade A ではほ

ば発生が確認されないのに対し、**Grade C** ではおよそ半数の卵子において確認された。

Grade C から得られた成熟卵子の染色体数のほとんどは $n=20$ であり、染色体の量的な異常はなかったことから、それらの約半数に生じていた PCS は「均衡型」であり、その後の過程で染色体の過不足が生じる可能性が示唆された。

本章の結果、マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養過程において、体外成熟培養時の卵丘細胞付着の減少に伴い、成熟率低下や PCS 発生率上昇が認められたことから、卵丘細胞付着程度の違いが未成熟卵母細胞の核成熟および PCS 発生に影響を与える因子であることが明らかとなった。

第 3 章 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた成熟卵子の評価

前章での結果、卵丘細胞付着程度の違いが成熟率低下や PCS 発生率上昇を引き起こしていることが明らかとなった。しかし、成熟率が低い、PCS 発生が高い培養条件において得られた成熟卵子が異常であるとは言えない。そこで本章では、得られた成熟卵子の正常性を調べるべく、卵子の細胞小器官や、受精能、胚発生能、染色体数を評価した。

まず、紡錘体および染色体の形態を調べるために、微小管を構成する α -tubulin に対する免疫蛍光染色を行った。その結果、**Grade A** ではコンパクトな樽型の形態を示し、染色体は紡錘体内に一直列に整列していたが、**Grade C** では紡錘体が伸長し、長方形様の形態を示し、紡錘体範囲外にも一部逸脱した染色体が観察された（図 3）。

次に、体外受精を行うため、ICR 雄マウスの精巣上体より精子を回収し、キャパシテーション後 20 万精子/ml で媒精を行った。媒精 6 時間後に前核を確認し、24 時間後に 2 細胞形成、120 時間後に胚盤胞形成の確認を行った。その結果、卵丘細胞付着の減少に伴い、有意に受精率、2 細胞形成率、胚盤胞形成率が低下していた（表 7）。

次に、受精後の染色体分配が正しく行われたかを評価するため、前核確認 7 時間後にコルセミド処理を 5 時間行い、染色体標本作製により第一分割期における染色体数をカウントした（図 4）。その結果、卵丘細胞付着の減少に伴い、染色体数正常率が低下していた（表 8）。また、**Grade C** では染色体過剰の割合も上昇しており、トリソミーが高頻度に発生していた。

これまでに検討を行った **Grade C** の未成熟裸化卵母細胞は、退行過程の卵胞より回収されたために染色体異常や、受精率、胚発生率低下が見られた可能性があることから、受精率、胚発生率が良好であった **Grade A** の未成熟卵母細胞をピペッティングによって人為的に裸化を行うことで、**Grade C** の卵母細胞と成熟率、受精率、胚発生率、染色体数に違いが見られるか評価を行った。その結果、人為的裸化卵母細胞において成熟率、2 細胞形成率が有意に上昇していたが、受精率、胚盤胞形成率は裸化卵母細胞と差は見られなかった（表 9）。また、得られた成熟卵子の染色体数正常率は、裸化卵母細胞において人為的裸化卵母細胞と差は見られないもののわずかに高く、PCS 発生率はどちらも高値であり、差は見ら

れなかった（表 10）。

本章の結果、卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた成熟卵子は、卵丘細胞付着の減少に伴い紡錘体形態や染色体配列が異常となることが明らかとなった。また受精、胚発生能においては、卵丘細胞付着の減少に伴い、受精率、2細胞形成率、胚盤胞形成率の有意な低下が認められた。さらに、受精後第一分割期における染色体数においても、付着卵丘細胞の減少に伴い、染色体数異常率の上昇が認められた。よって、卵丘細胞付着が乏しい未成熟卵母細胞の体外成熟過程において生じた PCS が、受精後第二減数分裂の際の染色体分配に影響を及ぼし、染色体異常につながった可能性が示唆された。

また、採卵時に既に裸化状態の未成熟卵母細胞は、人為的に裸化処理を行った未成熟卵母細胞よりも核成熟能が有意に低いことから、退行過程にある卵子も多く存在していたことが示唆された。一方で、受精率、胚発生率、PCS 発生率においては、体外成熟培養時に裸化状態であった卵母細胞と同様の傾向であったことから、体外成熟培養時の卵丘細胞付着が、重要な役割を果たしていることが再確認された。

第 4 章 未成熟裸化卵母細胞の早期姉妹染色分体分離を誘発する要因の探索

前章の結果、卵丘細胞付着が様々な未成熟卵母細胞から得られた成熟卵子において、PCS 発生率が高かった培養条件において受精率、胚発生率が低下し、分割期における染色体数異常率が上昇していたことが明らかとなった。よって受精率、胚発生率が高く、染色体数正常な卵子を得るためには、PCS 発生を低下させることが重要であると考えられるが、PCS 発生のメカニズムは明らかになっていない。そこで本章では、PCS 発生を誘発する要因を探るべく検討を行った。

まず、MII 期（第二減数分裂中期）にて既に PCS が起きていたことから、PCS 発生のタイミングを探るべく、体外成熟過程における卵子の核成熟進行を調べた。その結果、体外成熟培養 6 時間で 90%以上の卵子が卵核胞崩壊（GVBD）を起こし、8 時間では既に 70～80%の卵子が MII 期に達していた。このことから、培養 6 時間を第一減数分裂期と考え、因子の探索を行った。

次に、紡錘体の形態を調べるために、微小管を構成する α -tubulin に対する免疫蛍光染色を行った。その結果、卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、紡錘体形態の違いは見られなかったが、人為的裸化卵母細胞において染色体に付着する紡錘糸が粗な様子が観察された（図 5）。

次に、染色体が正しく微小管に捕えられていることを確認するチェックポイントである Mad2 に対する免疫蛍光染色を行った。その結果、卵丘細胞付着卵母細胞と人為的裸化卵母細胞において、Mad2 の分布に違いは見られず、紡錘体と同様の分布が確認された（図 6）。

本章の結果、本検討での培養条件による PCS の発生は、第一減数分裂時の染色体への紡錘糸の付着過程や機能にも原因がある可能性が示唆された。

第5章 早期姉妹染色分体分離を抑制する試み

前章までの結果から、卵丘細胞付着程度の違いが、第一減数分裂時の紡錘体機能に影響を及ぼし、PCS 発生を引き起こしていることが示唆され、体外成熟培養技術や培養条件を改善することによって、PCS 発生を抑制する必要がある。そこで本章では、組成の異なる培地や、裸化卵母細胞と卵丘細胞との共培養を行った場合の染色体数を評価することで、PCS 発生抑制の手掛かりにならないか検討を行った。

まず、これまでに体外成熟培養に用いていた培地である Waymouth's MB752/1 は、糖類や無機塩類をはじめ、ビタミン・アミノ酸が豊富な組織培地であることから、糖類や無機塩類のみの単純組成培地である HTF (human tubal fluid) 培地と受精能、胚発生能および染色体数の比較を行った。その結果、成熟率に差は見られず、受精率において HTF 培地の卵丘細胞付着卵母細胞、人為的裸化卵母細胞は、Waymouth MB752/1 培地の人為的裸化卵母細胞よりも有意に高くなった。2 細胞形成率に差は見られなかったが、胚盤胞形成率において HTF 培地の卵丘細胞付着卵母細胞、人為的裸化卵母細胞は、Waymouth MB752/1 培地の卵丘細胞付着卵母細胞よりも有意に低く、また人為的裸化卵母細胞よりも有意に高くなった (表 11)。また、Waymouth MB752/1 培地では、卵丘細胞付着の有無で受精率、胚発生率に差が生じたが、HTF 培地では、卵丘細胞付着の有無に関わらず、受精率、胚発生率は同等であった。染色体数正常率に差は見られなかったものの、HTF 培地の卵丘細胞付着卵母細胞、人為的裸化卵母細胞は、Waymouth MB752/1 培地の人為的裸化卵母細胞よりも有意に PCS 発生率が低くなった (表 12)。また、Waymouth MB752/1 培地では、卵丘細胞付着の有無で PCS 発生率に差が生じたが、HTF 培地では、卵丘細胞付着の有無に関わらず、PCS 発生率は同等であった。

次に、人為的裸化処理を行った卵母細胞において、卵母細胞のみ培養を行った場合と、除去した卵丘細胞と再び共培養を行った場合の染色体数の比較を行った。その結果、染色体数正常率に差は見られないものの、卵丘細胞と共培養を行った人為的裸化卵母細胞において有意に PCS 発生率が低くなった (表 13)。

本章の結果、卵丘細胞付着が認められない卵母細胞は、単純組成培地で培養を行うこと、卵丘細胞と共培養を行うことで PCS 発生が抑制されることが明らかとなった。

第6章 総括

本研究では、染色体異常のリスクが低い体外成熟培養系を確立することを目的として、マウス卵子をモデルとして体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における卵子染色体異常を誘発する要因の究明と、体外成熟培養条件の改善を試みた。得られた主な結果は以下の通りである。

1. マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養において、卵丘細胞付着が成熟率および早期姉妹染色分体分離の発生率に影響を与え、受精率、胚発生率および受精後の染色体正常率にも影響を及ぼすことが明らかとなった。
2. マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養において、卵丘細胞付着の認められない卵母細胞は、単純組成培地の選択や卵丘細胞との共培養を行うことによって、早期姉妹染色分体分離の発生を抑制できることが明らかとなった。

本研究で明らかとなった、体外成熟過程における早期姉妹染色分体分離の発生とその抑制法は、体外成熟卵子の受精率、胚発生率、着床率の改善へと役立つものと思われる。また、ヒト生殖補助医療分野における難治症例における救済策となり、畜産分野においても、希少動物における卵母細胞の体外成熟培養において有効な技術となる可能性がある。また、PCS 発生がもたらす次世代への影響への手掛かりとなり、最終的には健児の獲得へとつながる、さらに染色体異常発生の低い体外成熟培技術の開発へ繋がるものと期待される。

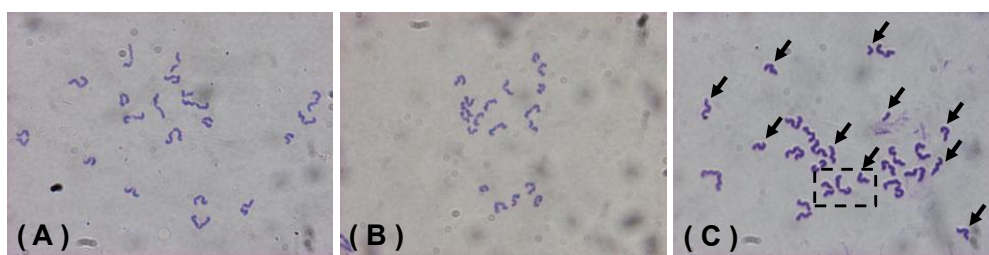


図1. ギムザ染色による第二減数分裂中 (Metaphase II) 期卵子の染色体像

(A) 正倍数体 (Euploidy) $n=20$

(B) 染色体不足 (Hypoploidy) $n=19$

(C) 早期姉妹染色分体分離 (Premature chromatid separation; PCS) $n=20$

(C') 染色体拡大図

矢印は染色分体、矢頭は動原体部分を示す

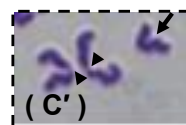


表1. 未成熟卵母細胞の体外成熟培養による成熟率

培地	供試卵子数	GV (%)	GVBD (%)	MII (%)
Waymouth	157	5 (3.2)	9 (5.7)	143 (91.1)

表2. 体内成熟卵子と体外成熟卵子の卵子染色体数

供試卵子	分析 卵子数	Ploidy (%)				PCS (%)
		Euploid $n=20$	Hypoploid $n=15 - 19.5$	Hyperploid $n=20.5 - 25$	Diploid $n=40$	
体内成熟卵子	110	103 (93.6)	7 (6.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.9)
体外成熟卵子	109	102 (93.6)	7 (6.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.9)

有意差なし ($P>0.05$)

表3. 体外成熟培養時間の違いによる成熟率

培地	培養時間	供試卵子数	GV (%)	GVBD (%)	MII (%)
Waymouth	10h	123	2 (1.6)	4 (3.3)	117 (95.1)
	12h	122	1 (0.8)	5 (4.1)	116 (95.1)
	16h	145	1 (0.7)	4 (2.8)	140 (96.6)
	20h	135	0 (0.0)	3 (2.2)	132 (97.8)

有意差なし (P>0.05)

表4. 体外成熟培養時間の違いにより得られた成熟卵子の染色体数

培地	培養時間	分析卵子数	Ploidy (%)				PCS (%)
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	10h	93	87 (93.5)	6 (6.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.2)
	12h	90	84 (93.3)	6 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1)
	16h	104	93 (89.4)	10 (9.6)	0 (0.0)	1 (1.0)	2 (1.9)
	20h	94	85 (90.4)	8 (8.5)	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (1.1)

有意差なし (P>0.05)

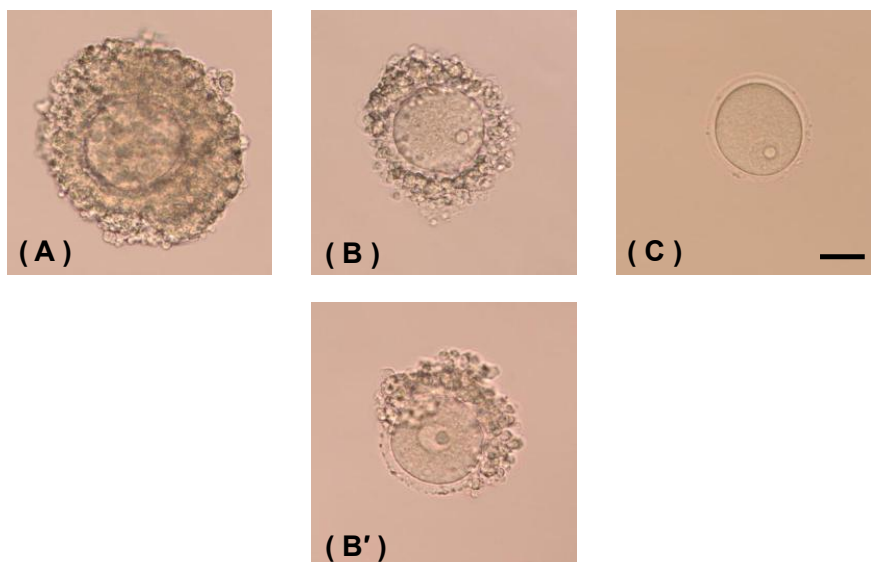


図2. 採卵時における卵丘細胞付着程度による未成熟卵母細胞の分類

(A) Grade A: 4層以上の密な卵丘細胞が付着

(B) Grade B: 3層以下の卵丘細胞が付着、(B') Grade B: 部分的に卵丘細胞が付着

(C) Grade C: 卵丘細胞の付着がなく、裸化状態

Bar=50μm

表5. 体外成熟培養時の卵丘細胞付着程度の違いによる成熟率

培地	卵丘細胞 付着程度	供試卵子数	GV (%)	GVBD (%)	MII (%)
Waymouth	Grade A	114	0 (0.0) ^a	2 (1.8) ^a	112 (98.2) ^a
	Grade B	95	9 (9.5) ^b	5 (5.3) ^a	81 (85.3) ^b
	Grade C	92	18 (19.6) ^c	24 (26.1) ^b	50 (54.3) ^c

^{a-c} 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表6. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた成熟卵子の染色体数

培地	卵丘細胞 付着程度	分析 卵子数	Ploidy (%)				PCS (%)
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	Grade A	89	84 (94.4)	5 (5.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1) ^a
	Grade B	66	63 (95.5)	3 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (10.6) ^b
	Grade C	53	46 (86.8)	1 (1.9)	3 (5.7)	3 (5.7)	25 (47.2) ^c

^{a-c} 異符号間に有意差あり (P<0.05)

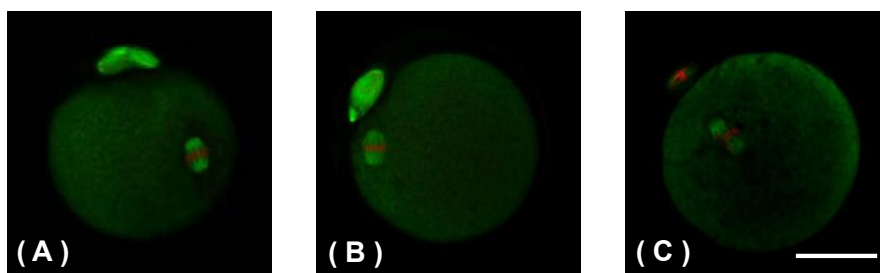


図3. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた第二減数分裂中 (Metaphase II) 期卵子の微小管および染色体の局在

(A) Grade A: 4層以上の密な卵丘細胞が付着

(B) Grade B: 3層以下の卵丘細胞が付着もしくは部分的に卵丘細胞が付着

(C) Grade C: 卵丘細胞の付着がなく、裸化状態

緑: 微小管 (α-tubulin)、赤: 染色体、Bar=50μm

表7. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた成熟卵子の受精・発生率

培地	卵丘細胞 付着程度	供試卵子数	2前核形成数 (%)	2細胞形成数 (%)	胚盤胞形成数 (%)
Waymouth	Grade A	106	93 (87.7) ^a	90 (96.8) ^a	78 (83.9) ^a
	Grade B	79	54 (68.4) ^b	48 (88.9) ^{a,b}	30 (55.6) ^b
	Grade C	52	25 (48.1) ^c	19 (76.0) ^b	7 (28.0) ^c

^{a-c} 異符号間に有意差あり (P<0.05)



図4. ギムザ染色による第一分割期胚の染色体像

- (A) 正倍数体 (Euploidy) $2n=40$
 (B) 染色体不足 (Hypoploidy) $2n=38$
 (C) 三倍体 (Triploidy) $3n=60$

表8. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた第一分割期胚の染色体数

培地	卵丘細胞 付着程度	分析 卵子数	Ploidy (%)			
			Euploid 2n=40	Hypoploid 2n=30 - 39	Hyperploid 2n=41 - 50	Triploid 3n=60
Waymouth	Grade A	38	32 (84.2)	2 (5.3)	2 (5.3)	2 (5.3)
	Grade B	20	15 (75.0)	5 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Grade C	13	7 (53.8)	2 (15.4)	4 (30.8)	0 (0.0)

有意差なし (P>0.05)

表9. 裸化および人為的裸化卵母細胞より得られた成熟卵子の受精・発生率

培地	卵子の 状態	供試 卵子数	成熟卵子数 (%)	2前核形成数 (%)	2細胞形成数 (%)	胚盤胞形成数 (%)
Waymouth	裸化	102	52 (51.0) ^b	25 (48.1)	19 (76.0) ^b	7 (28.0)
	人為的 裸化	96	94 (97.9) ^a	57 (60.6)	55 (96.5) ^a	25 (43.9)

^{a-b} 異符号間に有意差あり (P<0.025)

表10. 裸化および人為的裸化卵母細胞より得られた成熟卵子の染色体数

培地	卵子の 状態	分析 卵子数	Ploidy (%)				PCS (%)
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	裸化	53	46 (86.8)	1 (1.9)	3 (5.7)	3 (5.7)	25 (47.2)
	人為的 裸化	83	78 (94.0)	4 (4.8)	0 (0.0)	1 (1.2)	42 (50.6)

有意差なし (P>0.05)

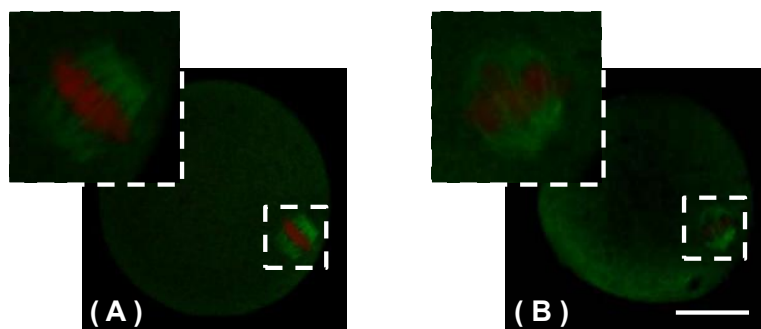


図5. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた第一減数分裂中 (Metaphase I) 期

卵子の微小管および染色体の局在

(A) 卵丘細胞付着卵母細胞

(B) 人為的裸化卵母細胞

緑:微小管 (α -tuburin)、赤:染色体、Bar=50 μ m

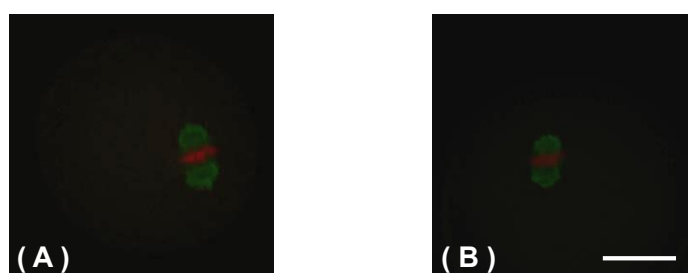


図6. 卵丘細胞付着程度の異なる未成熟卵母細胞より得られた第一減数分裂中 (Metaphase I) 期

卵子のMad2の局在

(A) 卵丘細胞付着卵母細胞

(B) 人為的裸化卵母細胞

緑:Mad2、赤:染色体、Bar=50 μ m

表11. 組成の異なる成熟培地から得られた成熟卵子の受精・発生率

培地	卵丘細胞 付着状態	供試 卵子数	成熟卵子数 (%)	2前核形成数 (%)	2細胞形成数 (%)	胚盤胞形成数 (%)
Waymouth	卵丘細胞 付着	112	106 (94.6)	93 (87.7) ^a	90 (96.8)	78 (83.9) ^a
	人為的 裸化卵子	102	94 (97.9)	57 (60.6) ^b	55 (96.5)	25 (43.9) ^b
HTF	卵丘細胞 付着	108	105 (97.2)	86 (81.9)	84 (97.7)	56 (65.1)
	人為的 裸化卵子	110	108 (98.2)	97 (89.8)	93 (95.9)	58 (59.8)

^{a-b} 同培地の異符号間に有意差あり (P<0.025)

表12. 組成の異なる成熟培地から得られた成熟卵子の染色体数

培地	卵丘細胞 付着状態	分析 卵子数	Ploidy (%)				PCS (%)
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	卵丘細胞 付着	89	84 (94.4)	5 (5.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1) ^a
	人為的 裸化	83	78 (94.0)	4 (4.8)	0 (0.0)	1 (1.2)	42 (50.6) ^b
HTF	卵丘細胞 付着	87	80 (92.0)	6 (6.9)	1 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
	人為的 裸化	90	87 (96.7)	2 (2.2)	0 (0.0)	1 (1.1)	3 (3.3)

^{a-b} 同培地の異符号間に有意差あり (P<0.005)

表13. 卵丘細胞共培養の有無により得られた成熟卵子の染色体数

培地	卵丘細胞 の状態	分析 卵子数	Ploidy (%)				PCS (%)
			Euploid n=20	Hypoploid n=15 - 19.5	Hyperploid n=20.5 - 25	Diploid n=40	
Waymouth	人為的裸化	37	35 (94.6)	2 (5.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	22 (59.5) ^b
	卵丘細胞 共培養	38	33 (86.8)	4 (10.5)	1 (2.6)	0 (0.0)	13 (34.2) ^a

^{a-b} 異符号間に有意差あり (P<0.05)

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	菊地 裕幸
審 査 委 員	主査：教授 種村 健太郎 副査：教授 麻生 久 教授 豊水 正昭
学 位 論 文 題 目	体外成熟培養下の未成熟卵母細胞における早期姉妹染色分体分離の誘発要因究明
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>未成熟卵母細胞の体外成熟培養は、ヒト不妊治療において副作用リスク軽減の観点から、有用な技術として行われており、1991年に初の妊娠出産例が報告されている。また近年、白血病やガン疾患患者における妊孕性温存を目的とした、多数の未成熟卵母細胞を含む卵巣組織や切片での凍結保存も可能となり、原疾患治療後に妊娠を望む際に体外成熟培養技術が必要となる。</p> <p>しかし、体内成熟卵子に比較し体外成熟卵子の受精率、胚発生率、着床率は未だ低いのが現状であり、その一因として卵子の染色体異常が挙げられる。</p> <p>卵子の染色体異常は主に第一減数分裂時の分離異常によって生じることが報告されていることから、体外成熟培養過程における染色体異常の発生が、体内成熟卵子と比較し低下している原因であることが推察される。ヒト卵子の染色体異常は他の動物種と比較して高く、染色体異常の種類によっては出生まで可能な場合もあるが、それら出生児は精神遅滞、奇形などの先天性疾患</p>	

を伴う場合も多いことから、染色体異常リスクを軽減させる必要がある。そこで本研究では、体外成熟培養過程における染色体異常発生リスクが低い最適な培養系を確立するため、染色体異常を誘発する培養条件の探索とその誘発要因究明、さらに改善法について、マウスをモデルとして検討した。

得られた結果は以下の通りである。

1) マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養において、卵丘細胞付着が成熟率および早期姉妹染色分体分離の発生率に影響を与え、受精率、胚発生率および受精後の染色体正常率にも影響を及ぼすことが明らかとなった。2) マウス未成熟卵母細胞の体外成熟培養において、卵丘細胞付着の認められない卵母細胞は、単純組成培地の選択や卵丘細胞との共培養を行うことによって、早期姉妹染色分体分離の発生を抑制でき、受精率、胚発生率が改善されることが明らかとなった。

本研究から、体外成熟培養過程における早期姉妹染色分体分離を引き起こす培養系とその改善法が明らかとなり、体外成熟卵子の受精率、胚発生率、着床率を改善させることが可能になるとともに、より染色体異常発生リスクの低く、健児の獲得へとつながる培養法の開発に貢献できると考えられる。また、ヒト生殖補助医療分野における高齢個体においても頻発する早期姉妹染色分体分離の原因究明と、それらの染色体異常を持った卵子がもたらす次世代への影響への手掛かりとなると考えられる。

したがって審査の結果、本研究は博士（農学）の学位に相応しい内容であると判定した。